

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780118

研究課題名（和文）クサカゲロウ由来麻痺成分の構造活性相関

研究課題名（英文） Structure-activity relationship of paralytic factors of green lacewings

研究代表者

西脇 寿 (NISHIWAKI HISAHI)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：30508784

研究成果の概要（和文）：脈翅目に属するニッポンクサカゲロウがえさ昆虫を捕食する際に利用している麻痺活性物質を単離精製し、その物質が生産される部位や時期に関して知見を得ることを目的とした。幼虫より採取した吐き戻し液から麻痺活性成分を精製し、主要な1成分にまで絞り込んだ。そのタンパク質のN末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列をもとにして縮重プライマーを作成し、クサカゲロウ幼虫から調製したcDNAを鋳型としてPCRによる増幅を試みた。その結果、いくつかのプライマーの組み合わせにより増幅するバンドが確認された。

研究成果の概要（英文）：A fraction containing a paralytic substance purified from *Chrysoperla nipponensis* using the various column chromatographies was found to show the acute toxicity against houseflies. A target band of the SDS PAGE gel was digested by proteases to elucidate parts of its amino acid sequence using the LC-MS/MS. Some PCR products were then amplified using the degenerated primers, which were designed based on the elucidated amino acid sequences.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質，ニッポンクサカゲロウ，麻痺活性物質，農薬科学

## 1. 研究開始当初の背景

吸汁性肉食昆虫は、捕食の際に口器をえさ昆虫に突き刺して、消化酵素を含む吐き戻し液を注入することにより体外消化を行い、その消化液を摂取している。捕食中にえさ昆虫に動き回られては非常に労力がかかるため、打ち込む吐き戻し液の中には即効的に昆虫を麻痺させる成分が含まれていると一般的に考えられている。しかしながら、世界的に見てもその単離例は極めて少ない。アミメカゲロウ目クサカゲロウ科に属するニッポンクサカゲロウの幼虫は、天敵農薬として登録されており、アブラムシの防除に使用されて

いるほど人畜無害な昆虫である。この幼虫も吸汁性肉食昆虫であり、捕食されたアブラムシやイエバエの幼虫には即効性の麻痺症状が認められた。さらに、吐き戻し液自体の殺虫効果を昆虫に注射投与して調べたところ、数百倍希釈したものにさえも麻痺症状が認められた。これらのことは、この幼虫の吐き戻し液中にヒトには安全で、かつ、昆虫には高活性を示す麻痺成分が含まれていることを強く示唆している。平成20～21年度科学研究費補助金（若手スタートアップ）をうけてクサカゲロウを継代飼育する環境を整え、活性物質の精製を試みたところ、活性成

分は高分子量を有するタンパク質であることを突き止め、候補として数種のものまで絞り込むことができた。この成分に関して他では研究されておらず、これ以外の情報は無い。

吸汁性肉食昆虫の毒素に関する先行研究として、クロコウスバカゲロウの毒素に関する研究があり、数種の物質が単離されている。しかし、これらはクサカゲロウの吐き戻し液に含まれている麻痺活性候補物質とは分子量が異なり、既知毒素に対する抗体を用いた Western blot でも検出されないことから、本成分は新規構造を有する可能性が高い。国内外の研究を概観すると、ハチやサソリなどの毒素を単離する研究は精力的にすすめられているものの、低分子量物質やペプチド性のものが多く、本研究課題のように高分子量タンパク質であることは少ない。農薬科学分野、昆虫生理学、毒素研究分野の発展に寄与する本研究は重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

ニッポンクサカゲロウ (*Chrysoperla nipponensis*) 幼虫の吐き戻し液から精製した麻痺活性を示すタンパク質に関して1) 全アミノ酸配列を解明するとともに、どこで合成されているのかを特定する。2) 麻痺活性を示すために必要な最少単位を明らかにすることを旨として構造活性相関を解析する。3) この麻痺活性物質がどのような昆虫種にその効果を発揮するのかを明らかにするとともに、作用部位に関して知見を得る。これらの研究を通じて、新規害虫制御剤の母核を提示することを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

これまでに、麻痺活性候補物質を 50 kD 以上の分子量を有する数種のタンパク質にまで絞りこむことができていた。そこで、はじめにその中から活性物質をひとつに特定すべく、さらなる精製を試みた。精製する際には高速液体クロマトグラフィー (HPLC: AKTA explorer, GE Lifesciences) を使用し、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、疎水性カラムに加えてヒドロキシアパタイトカラムを使用した。活性を示す画分を決定するために、炭酸ガスにより麻酔をかけたイエバエ (*Musca domestica*) オス成虫に各フラクション溶液を注射投与し、15 分後に炭酸ガス麻酔から回復するかどうかで画分が即効性を示すのか調べた。なお、活性の認められない画分を注射投与した際にはすべてのイエバエが回復して正常状態になることを確認している。さらに、注射投与した画分中のタンパク質濃度を Bradford 法により求め (標準物質として牛血清アルブミンを使用)、麻痺活性の指標として最少麻痺効果薬量

(Minimum Palaritic Dose (MPD), ng/insect) を算出した。

カラムにより精製した麻痺活性を示すタンパク質を含む画分を SDS-PAGE で分析し、CBB 染色で認められたタンパク質由来のバンドを切り出した。タンパク質の内部アミノ酸配列に関する情報を得るために、消化酵素として trypsin や endoproteinase Asp-N を用いて *in gel* 消化をおこなった。そして、酵素消化により得られたペプチドを回収して、LC-Q-ToF MS (UPLC-Xevo Q-ToF MS, waters) を用いた MS/MS 解析によりペプチド配列を明らかにした。また、N 末端アミノ酸配列は、PVDF 膜に転写した後プロテインシーケンサーにより解析した。以上のようにして得られたアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを作成した。

ニッポンクサカゲロウ 3 齢幼虫を Trizol 試薬中で摩砕した後、プロトコールに従い操作することで Total RNA を抽出し、逆転写 PCR をおこなうことで cDNA を調製した。その cDNA をテンプレートとして KOD plus NEO を用いて PCR 反応をかけた。そして、アミノ酸配列をもとに作成した縮重プライマーのうち、特定の組み合わせで得られた PCR 産物をクローニングした。

## 4. 研究成果

各種カラムクロマトグラフィーにより精製をすすめたところ (図1および2)、2つの band にまで精製することができた (図3)。精製することにより殺虫活性は上昇し、60 ng/insect の濃度で殺虫効果を発揮した。

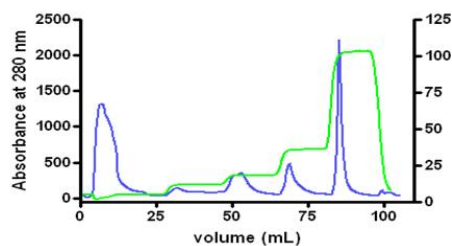


図1 ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーのチャート

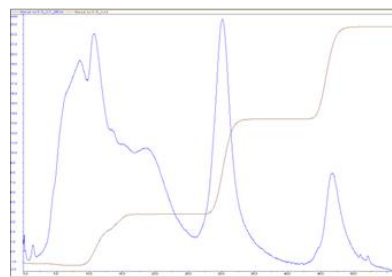


図2 イオン交換クロマトグラフィーのチャート

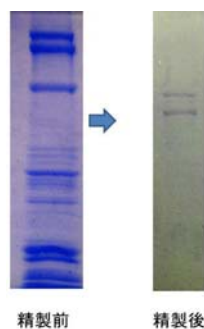


図3 精製前と精製後の SDS-PAGE

その後、さらに精製条件を詳細に検討することにより単一のバンドにまで精製することができた。その単一バンドに含まれるタンパク質のN末端アミノ酸配列をエドマン分析により解析したところ、4アミノ酸残基を決定することができた。また、LC-MS/MS解析により4か所の明白な内部アミノ酸配列を明らかにすることができた。これらのアミノ酸配列から縮重プライマーを作成し、クサカゲロウ幼虫から調製したcDNAを鋳型としてPCRによる増幅を試みた結果、いくつかのプライマーの組み合わせにより増幅するバンドが確認された。得られたPCR産物をpCR Script Cloning kitを用いてクローニングした。

申請時の計画では、研究終了までに活性タンパク質の全一次構造を明らかにすることを目指した。さらに、その成分が本当に生理活性物質であるのか確認を得るために、その組換え体タンパク質を作成することを目標に掲げていた。しかし、実際は活性タンパク質の絞り込みに予想以上に時間がかかってしまい、予定していた実験にまでこぎつけることができなかった。これは目的とするタンパク質が精製過程で不安定だったことに起因している。本研究では、内部アミノ酸配列やN末端配列をもとにして、麻痺活性物質をコードする遺伝子の部分配列を明らかにすることができた。本研究で明らかにした配列をもとに3'-および5'-RACEを試みることは容易である。また、麻痺活性物質遺伝子の塩基配列の中から毒素特異的な領域を探索し、その部位でプライマーを作成してreal time PCR解析することにより、このタンパク質がクサカゲロウ体内のどの部位で、どの時期に特異的に発現しているのか特定することもできる。以上のように現在着実に研究成果が出始めており、今後は研究成果をインパクトの高い研究として確実に公表できるように努めていく。

麻痺活性物質のターゲットのひとつとなりうるニコチン性アセチルコリン受容体とその受容体に作用する殺虫剤イミダクロプ

リド(IMI)に関する研究を並行して進めた。IMIのエチレン部位に着目し、この部位を種々修飾した類縁化合物を有機合成し、受容体親和性を測定した後、定量的構造活性相関解析(QSAR)の手法であるHansch-Fujita法ならびにComparative Molecular Field Analysis法を用いて解析することにより、受容体との結合に重要なエチレン部位周辺の構造要因を明らかにすることができた。また、これらのQSAR解析の結果が妥当であるのかを検証するために、IMIが結合しているアセチルコリン結合タンパク質(*Lymnaea stagnalis*由来)のX線結晶構造をもとにイェバエ受容体(subunit 6 (isoform II))の配列を用いてリガンド-受容体結合モデルを作成した。作成したモデルのリガンド結合部位において、ある程度の大きさの置換基を受け入れることができる空間がエチレン部位付近に認められた。この空間は主に芳香族アミノ酸に取り囲まれて構成されており、導入したアルキル基とCH- $\pi$ 相互作用をする可能性があると考えられた。さらに、受容体親和性と殺虫活性との相関関係を解析したところ、両活性間には高い正の相関関係があることを確認し、エチレン部位を修飾しても殺虫活性には受容体親和性が重要であること、言い換えれば、この部位に置換基を有する受容体親和性の高い化合物を設計すれば、殺虫効果の高い化合物を見出せる可能性が高くなると考えられた(Nishiwaki, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012)。

IMIのイミダゾリジン環が開環したネオニコチノイド系殺虫剤が数多く上市しているため、このエチレン部位はファーマコフォアとして重要視されていない。しかしながら本研究では、この部位に光学活性を示すように置換基を導入した化合物を種々調製したことにより、受容体親和性の上昇が期待できる新たな構造修飾位置を見出すことができた。作成したモデルを用いて置換基の種類を検討すると同時に、代謝の影響を考慮しながら置換基導入部位を選ぶことにより、受容体親和性が高く、かつ、代謝分解の影響を低下させた化合物を提案することができると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

1. Nishiwaki, H., Kuriyama, M., Nagaoka, H., Kato, A., Yamauchi, S., Shuto, Y.: Synthesis of imidacloprid derivatives with a chiral alkylated imidazolidine ring and evaluation of their insecticidal activity and affinity to the nicotinic

acetylcholine receptor. Bioorg. Med. Chem.,  
20 (21): 6305-6312. (2012) 査読有

〔学会発表〕(計32件)

1. 松浦茉佑・西脇寿・原有助・久保卓也・  
山内聡・首藤義博：ニッポンクサカゲロウの  
殺虫活性成分の単離. 第27回農薬デザイン  
研究会, 東京, 11月8日, 講演要旨集 3  
7. (2012)

2. 松浦茉佑・西脇寿・原有助・菅原卓也・  
山内聡・首藤義博：クサカゲロウ由来の麻痺  
活性物質. 日本農芸化学会中四国支部第33  
回講演会, 松山, 6月2日, 講演要旨集 3  
6. (2012)

3. 西脇寿：天然由来の昆虫制御物質. 日本  
農芸化学会中四国支部 第18回市民フォー  
ラム, 松山, 5月26日, 講演要旨集 9  
-11. (2012)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西脇 寿 (NISHIWAKI HISASHI)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：30508784